

UN NUOVO PROCESSO DI SELEZIONE DEI LIEVITI PER L'ESPRESSIONE DELL'AROMA VARIETALE DI SAUVIGNON BLANC

Charlotte AUGUSTIN¹, Stéphane BONHOMME², Marie-Laure MURAT², Isabelle MASNEUF³

¹Laffort Œnologie, BP 17, 33015 Bordeaux Cedex. Mail : caugustin@sarco.fr

²SARCO, BP 40, 33015 Bordeaux Cedex. Société d'Application, de Recherche et de Conseil Œnologique, filiale de recherche de la société Laffort Œnologie

³ENITA de Bordeaux, 1 cours du Général de Gaulle, CS 40201, 33175 Gradignan cedex

Introduzione

L'aroma varietale del Sauvignon blanc è stato oggetto di numerosi lavori di ricerca negli ultimi anni: sono stati identificati tre composti aromatici del tipo tioli volatili che hanno un ruolo fondamentale nell'aroma varietale di Sauvignon blanc. Si tratta del 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (4MMP), del 3-mercapto-esan-1-olo (3MH) e dell'acetato di 3-mercapto-esile (A3MH), responsabili delle note di bosso (4MMP, A3MH), di ginestra (4MMP), di pompelmo (3MH) e di frutto della passione (3MH, A3MH) nei vini derivate da uve di questa varietà. Questi composti sono presenti anche in vini derivanti da altre varietà come Gewürztraminer, Riesling, Colombard, Petit Manseng (Tominaga *et al.*, 2000a), oltre che in vini rossi Cabernet sauvignon e Merlot (Murat *et al.*, 2001a), Grenache e Syrah (Cacho, 2004 ; Murat, 2005).

Due composti solforati (4MMP e 3MH) sono presenti nei mosti sotto forma di precursori non volatili S-coniugati alla cisteina (Tominaga *et al.*, 1995, 1998a ; Murat *et al.*, 2001b). I tioli volatili sono liberati dal lievito durante la fermentazione alcolica a partire dagli S-coniugati corrispondenti (Tominaga *et al.*, 1998a), anche se non è ancora noto il meccanismo di trasformazione dei precursori legati alla cisteina in aromi. Non tutti i ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* hanno la stessa attività rispetto a questa azione di rivelazione dei tioli (Murat *et al.*, 2001c ; Howell *et al.*, 2004), così come varia secondo il ceppo la capacità di produzione di aromi fermentativi (esteri, alcool superiori prodotti nel corso della fermentazione alcolica) (Rankine, 1967 ; Usseglio and Tomasset, 1967 ; Suomalainen, 1971).

La migliore conoscenza dell'aroma del Sauvignon blanc e l'applicazione di una tecnica classica d'ibridazione hanno permesso di sviluppare nuovi metodi più precisi ed efficaci per la selezione ed il miglioramento dei lieviti enologici. Il laboratorio SARCO e la Faculté d'Œnologie di Bordeaux hanno quindi utilizzato la tecnica di "breeding", che consiste nell'ibridazione di due lieviti con l'obiettivo di ottenere un lievito "figlio" che possiede le caratteristiche dei due genitori (vedi figura 1). Con questa tecnica, ed incrociando un lievito con caratteristiche cinetiche superiori (cinetica fermentativa e resistenza all'alcool, bassa produzione di acidità volatile e di composti solforati) ad un altro con capacità di sviluppare vini di Sauvignon blanc tipici e con forte carattere varietale, si è giunti ad ottenere ed a commercializzare un nuovo ceppo X5.

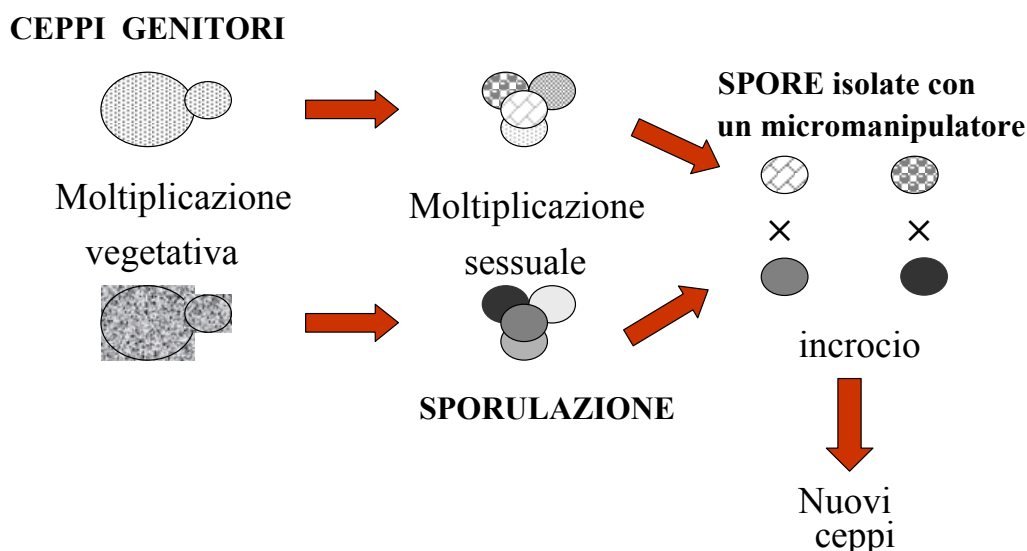


Figura 1 : Schema d'ottenimento di nuovi ceppi di lievito enologico con il metodo dell'incrocio o "breeding". I ceppi genitori possono appartenere alla stessa specie (*S. cerevisiae* o *S. uvarum*) o a due specie diverse (*S. cerevisiae* e *S. uvarum*).

L'obiettivo del lavoro è stato di studiare l'interesse del ceppo X5 e di mettere a confronto con altri ceppi di lievito le sue caratteristiche fermentative e le sue capacità di liberazione dei tioli volatili.

Materiale e metodi

Ceppi di lievito utilizzati. La prova ha mezzo a confronto complessivamente 7 ceppi di lievito secco attivo: VL3c e X5 , a confronto con 5 ceppi commerciali normalmente utilizzati per la produzione di vini da Sauvignon blanc tipici ed aromatico, denominati da A a E.

Protocollo delle prove. La prova è stata realizzata nel 2005, presso il centro sperimentale di Laffort Oenologie. Il mosto proveniva da uve Sauvignon blanc coltivate nella regione di Bordeaux. Al conferimento, le uve sono state pressate, enzimate e solfitate a 5 g/hl, quindi il mosto è stato raffreddato per la chiarifica (48h a 12°C). La torbidità del mosto è stata portata a 50 NTU. Le vasche utilizzate per la prova avevano una capacità di 200 litri; le sette tesi sono state fatte in duplicato. Tutte le operazioni prefermentative sono state condotte proteggendo il mosto dal contatto con l'aria (saturando i contenitori con CO₂ e mantenendo la copertura fino all'avvio della fermentazione alcolica). L'inoculo a 20 g/hl è stato realizzato subito dopo il travaso del mosto e la sua ripartizione dei diversi contenitori. La fermentazione si è svolta a 16°C. I vini sono stati solfitati una settimana dopo la fine della fermentazione alcolica, quindi conservati sulle fecce fini per circa due mesi, con 2 *batonnages* alla settimana.

Caratteristiche del mosto. La composizione del mosto di partenza è riassunta nella tabella 1. La carenza in azoto assimilabile osservata è stata corretta in modo da raggiungere il livello di 180 mgN/l.

	Zuccheri riduttori (g/L)	Acidità Totale (g/L H ₂ SO ₄)	pH	Torbidità (NTU)	Azoto assimilabile prima della correzione (mg N/L)
Mosto	213	3,8	3,24	120	101

Tabella 1 : Caratteristiche del mosto

Controllo della fermentazione alcolica. Durante l'intera durata della fermentazione sono state controllate quotidianamente la temperatura e la densità del mosto.

A 1,04 di densità è stato effettuato un controllo della dominanza del ceppo di lievito inoculato. A questo scopo, 100 µL di mosto prelevati dalla vasca sono stati inoculati su capsula Petri. Il DNA della biomassa totale è stato estratto e sottoposto ad analisi genetica per PCR (MiniCycler™, MJ Research) parallelamente all'analisi del DNA dei ceppi inoculati. L'elettroforesi permette di mettere a confronto i profili ottenuti sulle due biomasse e verificare in questo modo la dominanza.

Analisi chimiche e sensoriali dei vini. Le analisi base ed i dosaggi dei composti aromatici sono stati realizzati sui vini finiti dopo solfitazione. Il tenore in tioli volatili dei vini è stato determinato secondo il metodo descritto da Tominaga *et al.* (1998b) modificato dallo stesso autore (2000b). I contenuti in acetato d'isoamile (AI), acetato di fenil-etile (APE) e 2-fenil-etanolo (PE) sono stati misurati seguendo il metodo di Bertrand *et al.* (1978).

La degustazione alla cieca è stata effettuata da una giuria di 15 degustatori professionisti, abituati ad assaggiare vini Sauvignon blanc. Inizialmente è stato richiesto ai giudici di stilare una classifica (apprezzamento globale: colore, olfatto, gusto) dei 7 vini (assemblando i duplicati). In un secondo tempo tre campioni sono stati nuovamente sottoposti alla degustazione, chiedendo una valutazione da 1 a 5 (5 per l'intensità massima) di 6 descrittori: intensità olfattiva, tipicità Sauvignon blanc, note olfattive di bosso (descrittore di 4MMP e A3MH) e di pompelmo (descrittore del 3MH), morbidezza e persistenza in bocca. I tre campioni scelti per questo test descrittivo sono quelli che all'analisi chimica avevano rivelato i maggiori contenuti in 4MMP e A3MH. Su questi stessi tre vini è stato anche condotto un test di preferenza.

Analisi statistica dei risultati. Per l'elaborazione statistica dei dati analitici relativi al dosaggio dei tioli volatili e degli aromi di fermentazione è stato utilizzato l'applicativo Stata 9.0, con analisi della varianza e test di Scheffer. Per i test di preferenza alla degustazione è stato utilizzato il test di Kramer.

Risultati

Controlli di dominanza. In tutte le tesi il lievito inoculato si è dimostrato dominante (risultati non riportati). Questo permette di attribuire al ceppo di lievito le differenze riscontrate tra i vini, dal momento che esso rappresentava l'unica variabile.

Cinetiche di fermentazione. La fermentazione si è svolta nella maggioranza dei casi in 10 giorni. Solamente il ceppo D ha mostrato una fase di latenza maggiore di 48 ore ed ha portato a termine la fermentazione con due giorni di ritardo rispetto agli altri ceppi (risultati non riportati).

Analisi chimiche dei vini. Non si è rilevata nessuna differenza significativa tra i ceppi. La tabella 2 mostra la media dei valori ottenuti sui diversi vini.

	Alcool (%vol)	Zuccheri riduttori (g/L)	Acidità Totale (g/L H ₂ SO ₄)	Acidità Volatile (g/L H ₂ SO ₄)	pH	SO ₂ Totale (mg/L)
Vino	13	1,24	4,9	0,19	3,10	53

Tabella 2: caratteristiche dei vini finiti (valori medi delle 14 tesi).

Dosaggio dei tioli volatili. I contenuti dei vini in 4MMP sono risultati significativamente diversi (Figura 2 e Tabella 3).

<i>prova 2005</i>	4MMP (ng/L) (IA)	3MH (ng/L) (IA)	A3MH (ng/L) (IA)
X5	20,9 (26,1) ^a	274 (4,6) ^a	58 (14,5) ^a
VL3c	7,5 (9,4) ^b	303 (5,0) ^a	56 (13,9) ^a
ceppo A	8,5 (10,6) ^b	285 (4,7) ^a	53 (13,2) ^a
Ceppo B	6,3 (7,9) ^{bc}	220 (3,7) ^a	41 (10,1) ^a
Ceppo C	0,4 (0,5) ^d	202 (3,4) ^a	47 (11,7) ^a
Ceppo D	1,2 (1,5) ^d	188 (3,1) ^a	27 (6,6) ^a
Ceppo E	2,8 (3,4) ^{cd}	212 (3,5) ^a	43 (10,8) ^a

Tabella 3: contenuto in tioli volatili ed indice aromatico dei vini. I valori presentati sono le medie delle due ripetizioni. Le lettere ^{a, b, c, d} indicano i valori significativamente diversi all'analisi statistica (test de Scheffer).

*L'Indice Aromatico (IA) permette di valutare l'impatto aromatico di un composto: è il rapporto tra la concentrazione di una molecola e la sua soglia di percezione. Un indice aromatico superiore a 1 testimonia un ruolo importante del composto nel profilo organolettico del vino.

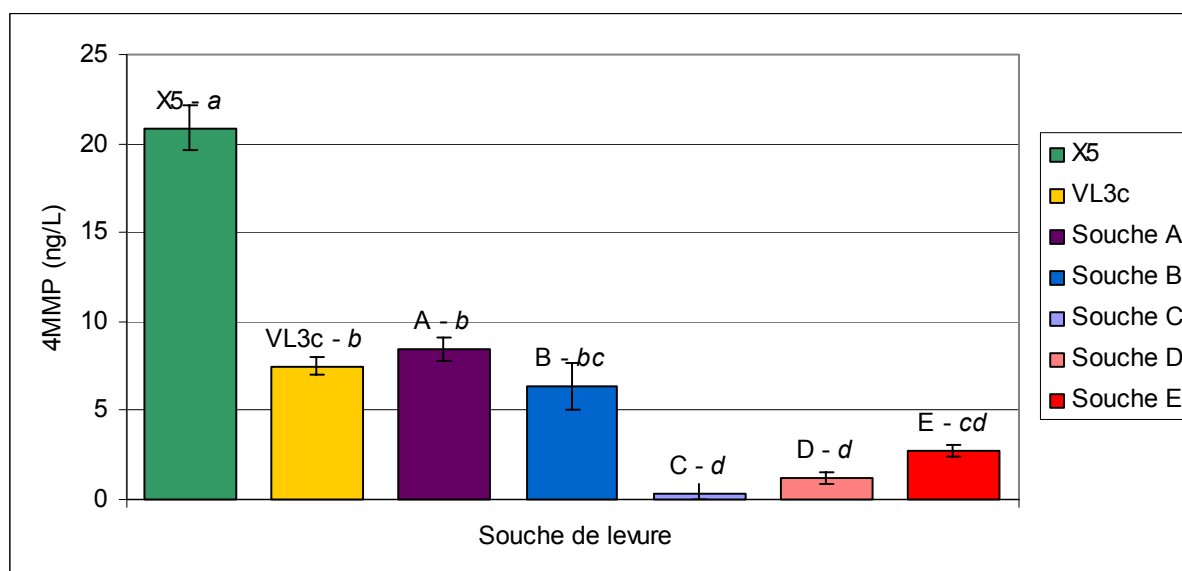


Figura 2 : Tenori in 4MMP (ng/L) nei vini ottenuti con diversi ceppi di lievito. Le barre sugli istogrammi indicano la deviazione standard per ogni ripetizione e le lettere a, b, c e d indicano le differenze statisticamente significative (test di Scheffer).

L'analisi statistica permette di mettere in evidenza che il ceppo X5 rivela più 4MMP di tutti gli altri ceppi utilizzati (figura 2). È interessante notare che questo ceppo, ottenuto per ibridazione, sviluppa più 4-MMP di tutti i ceppi fino ad ora selezionati con lo stesso obiettivo.

I ceppi A, VL3c e B presentano un potere di rivelazione intermedio e decrescente.

Non sono state notate differenze significative nella presenza nei vini di 3MH e di A3MH (tabella 3). D'altra parte, nell'annata in cui è stata condotta la prova, i contenuti di questi composti nei vini erano abbastanza bassi. Si può tuttavia notare che i vini ottenuti con i ceppi X5, VL3c e A sono più ricchi in A3MH (frutto della passione).

Contenuti in aromi fermentativi. Nelle condizioni di queste prove, non sono state osservate differenze nei contenuti in AI, APE e PE tra i vini ottenuti con ceppi diversi (vedi tabella 4). La produzione di esteri è del tutto simile.

In generale, una forte produzione di esteri di fermentazione non è un carattere ricercato nel lievito utilizzato per la produzione di vini Sauvignon blanc tipici e fruttati. Tuttavia, una produzione moderata (come in questa prova) contribuisce ad aumentare la complessità del profilo aromatico dei vini.

<i>prova 2005</i>	AI (mg/L) (IA)	APE (mg/L) (IA)	PE (mg/L) (IA)
X5	1,1 (5,3) ^{bc}	0,8 (2,5) ^{bc}	37 (74,2) ^a
VL3c	0,9 (4,3) ^{bc}	0,7 (2,4) ^{bc}	43 (66,7) ^a
Ceppo A	1,1 (5,5) ^{ab}	0,8 (2,6) ^{ab}	42 (84,7) ^a
Ceppo B	0,8 (3,9) ^c	0,7 (2,4) ^{bc}	50 (100,2) ^a
Ceppo C	0,9 (4,3) ^{bc}	0,7 (2,4) ^{bc}	37 (74,1) ^a
Ceppo D	0,8 (3,9) ^{bc}	0,6 (1,9) ^{bc}	38 (75,0) ^a
Ceppo E	0,8 (3,8) ^c	0,5 (1,8) ^c	46 (92,0) ^a

Tabella 4 : Tenore in esteri di fermentazione e 2-fenil-etanolo, e rispettivi indici aromatici dei vini. I valori riportati sono la media delle due ripetizione; le lettere ^a, ^b, ^c indicano le differenze statisticamente significative (test di Scheffer).

Analisi sensoriale. Il test di preferenza sui 7 campioni è significativo allo 0,1 % (test di Friedmann). Ne risulta una netta preferenza per i vini ottenuti con il ceppo X5 (significatività 1% al test di Kramer). Seguono nella classifica della preferenza i vini prodotti con i ceppi A e VL3c, che sono molto vicini tra di loro. I meno apprezzati sono stati i vini ottenuti con i ceppi B, C, D e E. Questa classifica di preferenza è ben riproducibile: i giudici hanno spesso ordinato nello stesso modo i vini. Per esempio, il vino ottenuto con il ceppo X5 è risultato primo classificato 10 volte su 15, ed il vino prodotto con il ceppo C ha ottenuto 11 volte la quinta posizione, il che corrisponde alla loro classificazione finale.

Esiste d'altro canto una correlazione statisticamente significativa tra la somma degli indici aromatici di 4MMP e A3MH e la posizione ottenuta dai vini alla degustazione ($R^2 = 0,7673$ significatività al 2 %, vedi Figura 3).

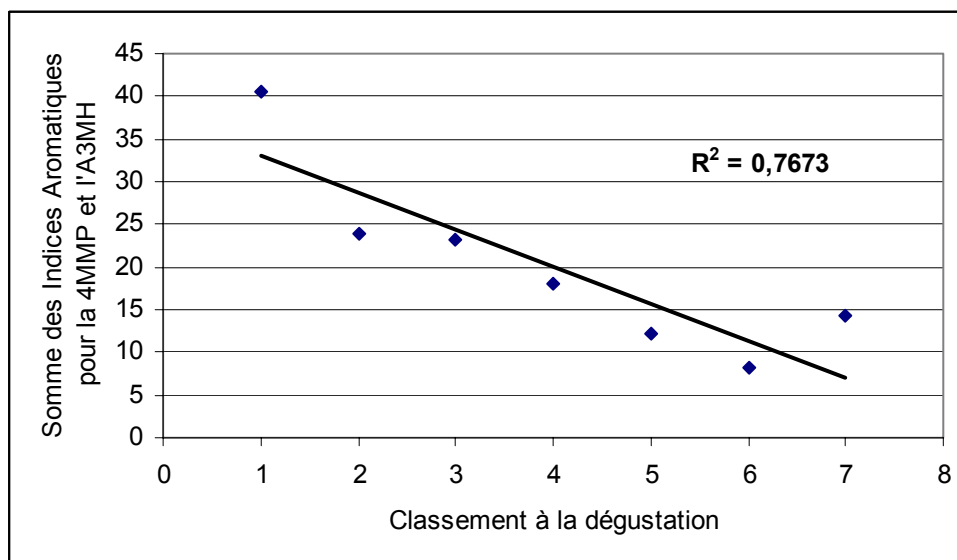


Figura 3 : Correlazione tra la somma degli indici aromatici di 4MMP e A3MH dei vini e la posizione nella classifica di preferenza ottenuta alla degustazione (correlazione significativa al 2%).

Il test descrittivo è stato effettuato sui tre vini che presentano i maggiori contenuti in 4MMP e A3MH, quindi sui vini ottenuti con i ceppi X5, VL3c e A. Questi sono anche i vini che sono risultati primi classificati nel test di preferenza. La figura 4 mostra i risultati di questa analisi descrittiva. Il vino fermentato con X5 è considerato dalla giuria il più tipico e quello con maggiore intensità olfattiva, con punteggi elevati per le note di bosso e pompelmo.

I vini ottenuti con i ceppi VL3c e A mostrano un profilo abbastanza simile, ma il test triangolare è risultato molto significativo (all'1% con il test di Kramer), dando netta preferenza al vino VL3c rispetto a quello fermentato con il ceppo A. I commenti sulle sensazioni gustative riportano spesso fruttato ed eleganza per il vino VL3c, mentre il vino ottenuto con il ceppo A prevaleva un rotondità. Anche sotto l'aspetto gustativo il vino fermentato con il ceppo X5 è risultato prima, ed apprezzato per l'equilibrio in bocca, la vivacità e la persistenza.

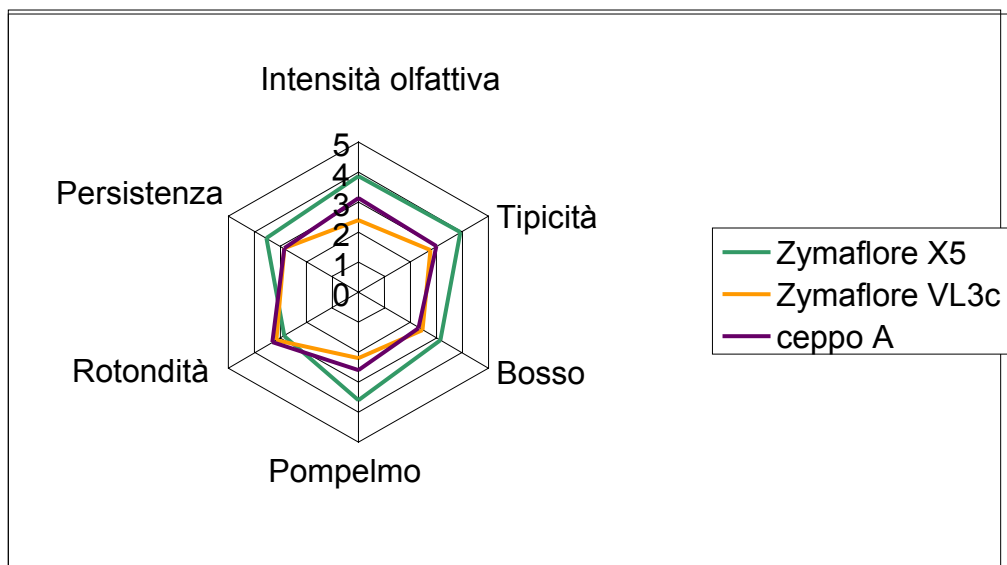


Figura 4 : analisi sensoriale descrittiva dei tre vini più ricchi in 4MMP (15 assaggiatori)
La classifica al test triangolare è stata: 1° vino X5; 2° vino VL3c; 3° vino ceppo A (significatività all'1% con test di Kramer)

Conclusioni

Sulla base dei risultati di queste prove di confronto, sembra che, sebbene tutti i ceppi abbiano mostrato comportamenti fermentativi soddisfacenti (fermentazioni completate, acidità volatili limitate, vini senza difetti), essi non si equivalgono rispetto alle caratteristiche organolettiche dei vini ottenuti. La degustazione prende in considerazione non solamente i criteri aromatici, ma anche le sensazioni gustative e la persistenza. I dosaggi chimici e l'analisi sensoriali hanno ancora una volta messo in evidenza l'importanza del ceppo di lievito nell'espressione degli aromi varietali del tipo tioli volatili.

Il ceppo X5 è nettamente emerso rispetto a tutti gli altri sia alla degustazione che all'analisi dei vini (tipicità, complessità, persistenza e vivacità). Questo ceppo permette d'ottenere vini con contenuti importanti di 4MMP e A3MH, composti tra l'altro ben correlati con la preferenza da parte dei degustatori. Tale capacità di rivelare il 4MMP conferma i risultati ottenuti nel 2004 nel centro sperimentale, che non sono stati qui presentanti in quanto mancanti dell'analisi statistica, ma dai quali emergeva già l'interesse del ceppo X5. Anche i vini ottenuti con VL3c sono stati apprezzati alla degustazione grazie al fruttato e all'eleganza espressi; inoltre i vini fermentati con il ceppo A sono stati considerati rotondi e persistenti. Tutti e tre i ceppi hanno mostrato una buona capacità di espressione dei tioli volatili, con una maggiore produzione di esteri di fermentazione per il ceppo A. Le differenze organolettiche riscontrate tra i tre ceppi possono essere valorizzate in occasione dell'assemblaggio.

L'ibridazione, applicata come nuova tecnica di selezione dei lieviti, dimostra qui il suo interesse: l'apprezzamento per il ceppo X5, già espresso dai produttori su numerosi mosti di Sauvignon, trova qui alcuni elementi aggiuntivi di giustificazione.

L'ibridazione è alla base anche di un altro lavoro che ha come obiettivo la selezione di un nuovo ceppo per l'elaborazione di vini rossi fruttati, i cui risultati saranno oggetto di una successiva pubblicazione.

Bibliografia

- Bertrand A., Marly-Brugerolle C., Sarre C., 1978. Influence du débouillage des moûts et du sulfitage sur les teneurs en substances volatiles des vins et eaux-de-vie. *Com. Vigne Vin*, **12**, 35-48.
- Cacho J., 2004. Relation entre l'analyse physicochimique et sensorielle des vins rosés. *Rencontres Internationales du Vin Rosé*, 12-13.
- Cotrell T.H.E. MC and Lellan M.R., 1986. The effect of fermentation temperature on chemical and sensory characteristics of wines from seven white grape cultivars grown in New York State. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 3, 190-194.
- Howell K.S., Swiegers J.H., Eley G.M., Siebert T.E., Bartowsky E.J., Flette G.H., Pretorius I.S., De Barros Lopes M.A., 2004. Variation in 4-mercapto-4-methylpentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol. Letters.* **240**, 125-129.
- Killiam E. and Ough C.S., 1979. Fermentation esters- formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* **30**, 4, 301-305.
- Murat M.L., Tominaga T., Dubourdieu D., 2001a. Mise en évidence de composés clefs dans l'arôme des vins rosés et claires de Bordeaux. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **35**, n°2, 99-105.
- Murat M.L., Tominaga T., Dubourdieu D., 2001b. Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rosé wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 11, 5412-5417.
- Murat M.L., Masneuf I., Darriet P., Lavigne V., Tominaga T., Dubourdieu D., 2001c. Effect of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wines. *Am. J. Enol. Vitic. Vol.* **53**, n°2, 136-139.
- Murat M.L., 2005. Acquisitions récentes sur l'arôme des vins rosés. Partie 1 : Caractérisation de l'arôme, étude du potentiel aromatique des raisins et des moûts. *Revue des Œnologues*, n°117, 27-30.
- Rankine B.C., 1967. Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste and thresholds. *J. Sci. Food Agric.* **18**, 181-198.
- Suomalainen H., 1971. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. *J. Inst. Brew.* **77**, 164-177.
- Tominaga T., Masneuf I., Dubourdieu D., 1995. A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of white sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **29**, 227-232.
- Tominaga T., Peyrot des Gachon C., Dubourdieu D., 1998a. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5215-5219.
- Tominaga T., Murat M.L., Dubourdieu D., 1998b. Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1044-1048.
- Tominaga T., Baltenweck-Guyot R., Peyrot des Gachon C., Dubourdieu D., 2000a. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, n°2, 178-181.
- Tominaga T., Blanchard L., Darriet P., Dubourdieu D., 2000b. A powerful aromatic volatile thiols, 2-furanmethanethiol, exhibiting roast coffee aroma in wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1799-1802.
- Torija M.J., Beltran G., Novo M., Poblet M., Guillamon J.M., Mas A., Rozès N., 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int. J. Food Microbiol.* **85**, 127-136.
- Usseglio, Tomasset L., 1967. L'alcol b-feniletílico nei vini. *Riv. Viticol. Enol.* **20**, 10-35.